



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

ESPECIALIZACIÓN EN DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO VETERINARIO

TRABAJO FINAL INTEGRADOR

ALUMNO: MV.Luciano Riegler

DIRECTOR: Dr. Traveria Gabriel

CODIRECTOR: MV. Pruzzo Cesar Ivan

## Plan de Trabajo

Aplicación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para el diagnóstico diferencial de ***Tritrichomona foetus*** en cultivos positivos de parásitos de la familia *Trichomonadidos*

**Tabla de contenidos:**

1. Introducción .....	3
I. Aspectos generales.....	3
II. Agente etiológico.....	4
III. Patogenia y respuesta inmune.....	4
IV. Signos clínicos.....	5
V. Impacto productivo y económico .....	6
VI. Diagnóstico .....	6
2. Objetivos e hipótesis.....	8
I. Objetivo .....	8
II. Hipótesis.....	8
3. Materiales y métodos.....	9
I. Obtención de las muestras .....	9
II. Cultivo.....	9
III. Extracción de ADN .....	9
IV. Estudios moleculares (PCR): .....	9
V. Interpretación de los resultados.....	11
4. Resultados .....	12
5. Discusión y conclusión .....	13
6. Anexo .....	14
7. Bibliografía .....	19

## 1. Introducción

### I. Aspectos generales

La tricomoniasis es una enfermedad cosmopolita y generalmente asociada a establecimientos en los que se realiza servicio por monta natural. Es una enfermedad venérea que afecta a los bovinos, producida por *Tritrichomonas foetus*, parásito protozario, flagelado, que produce infertilidad temporaria en la hembra. El toro se comporta como portador asintomático y diseminador de la enfermedad; éste rara vez se cura espontáneamente. *Tritrichomonas foetus* tiene como hábitat natural la cavidad prepucial del toro, colonizando la superficie de la mucosa prepucial, peneana y uretral distal (Sánchez y Boero, 2013).

La presencia de tricomoniasis en los rodeos ocasiona una disminución significativa de la producción anual de terneros, con importantes pérdidas económicas. En Argentina, la Comisión Provincial de Sanidad Animal (COPROSA) de la Provincia de Buenos Aires informó, que la región ganadera de la pampa húmeda, con un stock de 15 millones de vientres bovinos, pierde 1,8 millones de terneros por enfermedades venéreas (Soto y col., 2013).

El control de la enfermedad es difícil ya que no tienen un tratamiento específico y la vacunación de los toros no funciona satisfactoriamente. Así, el control de la tricomoniasis implica pruebas de diagnóstico en los toros para determinar su estado negativo antes del servicio y como parte de la sanidad de los programas de inseminación artificial (IA) (Cobo y col., 2007). El cultivo a partir de raspados prepuciales en medios selectivos y la posterior identificación de protozoos ha sido la prueba de diagnóstico utilizada más habitualmente para la tricomoniasis bovina en los toros. Sin embargo, la sensibilidad del cultivo en algunos estudios experimentales varió de 84 a 96% (Abbitt y col., 1979; Ondrak, 2016) y fue del 70% en condiciones subóptimas de campo. La falta de especificidad es otra limitación del cultivo de tricomonas, ya que pueden crecer otras *Trichomonadidos*, tales como *Tetratrichomas* spp. Y *Pentatrichomonas hominis*, morfológicamente similares a *T. foetus* (Cobo y col., 2007).

## II. Agente etiológico

*Tritrichomonas foetus*, es un parásito protozoario, flagelado, de forma piriforme, que mide 10 a 25  $\mu\text{M}$  de largo y 3 a 15  $\mu\text{M}$  de ancho, perteneciente a la familia *Trichomonadidae*. Tiene un flagelo posterior unido al soma mediante la membrana ondulante y tres flagelos anteriores (Vignau y col., 2001). Los mecanismos metabólicos de glicólisis son realizados mediante una organela de doble membrana denominada hidrogenosoma, la cual le permite al protozoo adaptarse a vivir en condiciones de anaerobiosis o microaerofilia (Cobo y Campero, 2002). En la cavidad prepucial del toro además de *T. foetus*, pueden encontrarse otras especies de *Trichomonadidas*, que presentan mayor tamaño, redondez y varían en el número de flagelos anteriores. Las otras especies del género *Trichomonas* que aparecen en los cultivos no son causales de enfermedad. (Hayes y col., 2003).

## III. Patogenia y respuesta inmune

La enfermedad se transmite por vía sexual, resultando suficiente 200 a 80.000 parásitos para establecer la infección en el prepucio de un toro. *Trichomonas foetus* reside normalmente en la mucosa superficial del tracto reproductor del hospedador y su habilidad para adherirse al epitelio vaginal es fundamental para la infección. La adhesión de *T. foetus* a la célula epitelial del tracto genital de la hembra bovina se inicia mediante el flagelo posterior y luego continúa por su soma. El complejo molecular, adhesina Tf 190, ubicado en la superficie de *T. foetus* también favorece la adhesión y citotoxicidad hacia la célula hospedador (Cobo y Campero, 2002). *Tritrichomonas foetus* puede ser aislado del tracto reproductor de la hembra bovina 4 días después del inicio de la infección, aunque no parece interferir con la concepción, el reconocimiento materno de la preñez o producir lesiones macroscópicas y microscópicas en el tracto reproductivo hasta los 50 días de gestación. En la mayoría de las hembras infectadas, hasta los 95 días post infección, se observan cambios inflamatorios leves con eventual pérdida del feto, (Ondrak, 2016). La mayor pérdida fetal se produce dentro de los primeros 5 meses de gestación, seguido de un período de 2 a 6 meses de infertilidad. El sistema inmunológico elimina el parásito del tracto reproductor femenino entre 5 a 20 semanas después de la infección. Las

excepciones incluyen la aparición de piómetras y vacas con infecciones prolongadas (Ondrak, 2016).

La duración de la respuesta inmune en las vacas parece no tener memoria frente a reinfecciones con *T. foetus*, más allá de los 15 meses. Por lo tanto, si se utilizan servicios estacionados, las vacas pueden retornar al estro y preñarse nuevamente al final de la temporada de reproducción, alargando así el intervalo entre partos y aumentando la cola de parición (Ondrak, 2016).

La enfermedad en el macho cursa generalmente en forma asintomática sin afectar la calidad seminal ni la libido. En toros mayores de 4 a 5 años, la recuperación espontánea raramente ocurre (menos del 10% de los toros afectados) y el toro se convierte en una fuente permanente de infección para el rodeo (*carrier*) (Cobo y Campero, 2002).

#### **IV. Signos clínicos**

Dentro de los signos clínicos en un rodeo infectado por *T. foetus* se mencionan la repetición de celos, piómetras, preñeces tardías en un servicio de 3-4 meses, baja tasa de preñez, prolongados intervalos entre partos y marcada cola de parición (Clark y col. 1983). La muerte embrionaria temprana, aborto e infertilidad temporal después de la eliminación de *T. foetus* son las causas de la terminación temprana de la preñez y retorno al celo. El retorno al estro, es el signo clínico más común en la infección de la hembra bovina. Por otro lado, la piómetra puede ser uno de los primeros signos clínicos de la infección, con presencia de abundantes cantidades de *T. foetus* en el contenido purulento (Ondrak, 2016). Aunque no es visible, la piómetra y maceración del feto pueden detectarse a través de la palpación transrectal del tracto reproductivo por un profesional experto y pueden ser un indicador temprano de la presencia de *T. foetus* en un rodeo. Además, se pueden detectar vacas con infecciones crónicas hasta 300 días post servicio y vacas portadoras (*carriers*) que permanecen infectadas durante incluso en una gestación aparentemente normal. Las vacas *carriers* presentan cultivos positivos a *T. foetus* hasta 9 semanas después de parir, siendo un riesgo potencial de infección en el rodeo (Ondrak, 2016; Cobo y Campero, 2002).

Basado en la opinión de expertos y las observaciones clínicas, se instauró un modelo de computación que estableció que en un brote de la enfermedad puede ocurrir (Ondrak, 2016):

\*Muerte embrionaria temprana: 13,1% a 50,2%

\*Abortos: 3,1% a 14,1%

\*Maceraciones fetales: 0,6% a 2,4%

\*Piómetras: 2,1% a 8,0%

\**Carriers*: 0,2% a 0,7%

\*Infertilidad postcura: 9,4% a 35,4%

## **V. Impacto productivo y económico**

La tricomoniasis en una explotación ganadera causa un efecto negativo sobre el rendimiento reproductivo del rodeo, lo que resulta en un menor número de vacas preñadas y, posteriormente, un menor número de terneros para venta. Otros factores relacionados con la tricomoniasis, que ejercen una influencia negativa en la rentabilidad del ganado de carne, incluyen alimentación y gastos de mantenimiento de las vacas no productivas, costos de reemplazo de toros infectados y vacas no productivas, las pruebas para el control de *T. foetus*, y el reducido peso al destete debido a los terneros nacidos tardíamente (Ondrak, 2016; Cobo y Campero, 2002).

En rodeos infectados por tricomoniasis, se puede alcanzar un porcentaje de vacas vacías al tacto entre 45,3% y 57%, resaltando el impacto de la enfermedad. Además, se citan reducciones entre 14% y 50% de la producción de terneros y 4 a 10% del retorno monetario por ternero nacido (Rae, 1989).

## **VI. Diagnóstico**

Las muestras para el diagnóstico de tricomoniasis se obtienen por medio de raspado o lavado prepucial del toro, el cual posteriormente se coloca en un medio de cultivo para su crecimiento y desarrollo (caldo a base de hígado). La muestra es incubada a 37°C y se observa cada 24 hs durante 7 a 10 días para detectar el desarrollo del patógeno. El diagnóstico está basado en la identificación microscópica del parásito teniendo en cuenta su forma y movimientos espasmódicos; en caso de ser necesario, se extrae una alícuota del fondo del medio y se tiñe con la tinción de Giemsa o T15 (Tinción 15 Biopur®) para una mayor precisión de sus estructuras. La muestra puede ser contaminada por otras especies de *Trichomonas*, como *Tetratrichomonas buttreyi*, y

*Pentatrichomonas hominis*, que se encuentran en el tracto digestivo del bovino, suelo, y agua estancada con orina y heces (Mutto y Giambiaggi, 2006). Con las técnicas de rutina es difícil diferenciar los flagelos y la forma de los distintos protozoarios.

En los últimos años se han desarrollado técnicas de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) que permiten diferenciar con mayor sensibilidad y especificidad las diferentes especies de *Trichomonas*, amplificando secuencias específicas de genes de la porción ARNr 5.8S y regiones internas laterales, ITS1 y ITS2. Estas secuencias son altamente conservadas en todas las especies de las diferentes regiones geográficas (Felleisen y col., 1998; Campero y col., 2003). Estudios de secuenciación de especies de trichomonas bovinas demostraron que el gen ARNr 5.8S para los cebadores TFR1 y TFR2 fueron altamente conservados entre todos los aislamientos secuenciados. El tamaño del producto de la PCR con TRF1-TRF2 solo podría ser usado para diferenciar los grupos de *Trichomonadidas*, sin embargo, el rango entre los diferentes grupos es de 50 pares de bases (pb). Para *Tritrichomonas foetus* amplifican productos de 371pb, *Pentatrichomonas hominis* 338 pb, y *Tetratrichomona* spp. entre 382 y 391pb, lo que hace dificultosa su interpretación (Hayes y col., 2003). Es por eso, que se desarrollaron cebadores TRF3-TRF4, los cuales amplifican segmentos de ADN específicos de la especie *T. foetus*, es decir que cualquier muestra no *T. foetus* no amplificará, y por lo tanto no será visible al revelado (Hayes y col., 2003).

Diferentes estudios han demostrado, que cuando se aplica la técnica de PCR un elevado porcentaje de toros positivos al cultivo presentan protozoos no-*T. foetus*. Campero y col., en el año 2003, describieron un 8.5% de muestras con protozoos no-*T. foetus* en un rodeo de toros vírgenes de uno a dos años de edad (Campero y col., 2003). Debido a todo, es que toman importancia los estudios de biología molecular en los toros con cultivo positivo en nuestro país, ya que las pérdidas económicas originadas en la eliminación de un toro con cultivo positivo a protozoos no-*T. foetus* son muy altas (Sanchez y col., 2013).

## **2. Objetivos e hipótesis**

### **I. Objetivo**

- Aplicar la técnica de PCR para diferenciar con mayor sensibilidad y especificidad a *Tritrichomonas foetus* de otros protozoos de morfología similar que crecen en los medios de cultivos.

### **II. Hipótesis**

- La técnica de PCR diferencia la especie de *Thichomonadidas* que crece y se desarrolla en los medios de cultivo.
- El uso de la técnica de PCR disminuye los falsos positivos de los cultivos de raspados prepuciales.



### 3. Materiales y métodos

- I. **Obtención de las muestras:** se utilizaron muestras de raspado prepucial que fueron remitidas por médicos veterinarios, de diferentes localidades de la Cuenca Deprimidas del Salado, para el diagnóstico de trichomonas al Centro de Diagnóstico e Investigaciones Veterinarias (CEDIVE), FCV UNLP durante el año 2015. que por técnicas habituales de cultivo y posterior tinción no se alcanzó un diagnóstico definitivo.
  - II. **Cultivo:** el cultivo se realizó en medios a base de caldo de hígado incubados a 37°C, los cuales se observaron microscópicamente cada 24 horas por 7 días. Los casos positivos fueron teñidos con tinción 15. Las muestras en las cuales no se pudieron identificar si los protozoos pertenecían a la especie *T. foetus*, fueron seleccionados y conservados a - 20°C para su posterior análisis.
  - III. **Extracción de ADN:** los medios de cultivo fueron descongelados y el contenido homogeneizado. Se extrajo del fondo de cada muestra 100 µl del medio de cultivo, la cual se colocó en un micro tubo de 1,5 ml. Posteriormente se realizaron 3 o 4 lavados con agua destilada estéril: los mismos consistieron en añadir 500 µl de agua destilada a cada tubo, centrifugar a la mayor velocidad posible y luego descartar el sobrenadante. Luego de realizado los lavados, el ADN se extrajo mediante un kit comercial (Zymo Research Quick-g DNA<sup>tm</sup> Miniprep<sup>®</sup>). Se utilizaron para este ensayo un control positivo de *Trichomonas foetus* (cepa CEDIVE), y uno de *Treptrichomonas* que habían sido diagnosticados por observación al microscopio y posterior tinción con T15.
- IV. **Estudios moleculares (PCR):**
- a. Amplificación del ADN: se utilizaron dos juegos de cebadores, TRF1- TRF2 que amplificaron el fragmento de 5.8S ARNr ITSr de todos los *Trichomonadidas* (TFR1: 5' -TGCTTCAGTTCAGCGGGTCTTCC-3', TFR2: 5'-CGGTAGGTGAACCTGCCGTTGG), y TRF3-TRF4 que amplificaron el fragmento 5.8S ARNr ITSr específico de *T. foetus*: TFR3: 5'-CGGGTCTTCCTATATGAGACAGAACC-3' y TFR4: 5'CCTGCCGTTGGATCAGTTTCGTAA-3'.

Se prepararon las mezclas correspondientes para cada juego de cebadores como se indica en la Tabla 1 y 2.

**Tabla 1. Componentes de la mezcla PCR para los cebadores TRF1 y TRF2.**

<b>Componentes MIX 1</b>	<b>Volumen (μl)</b>
<i>Agua</i>	35,5
<i>Buffer</i>	5
<i>ClMg</i>	2
<i>dNTPs</i>	1
<i>TRF1</i>	0,5
<i>TRF2</i>	0,5
<i>Taq pol</i>	0,5
<i>ADN</i>	5
<i>Volumen Final</i>	50

**Tabla 2. Componentes de la mezcla PCR para los cebadores TRF3 y TRF4.**

<b>Componentes MIX 2</b>	<b>Volumen (μl)</b>
<i>Agua</i>	35,5
<i>Buffer</i>	5
<i>ClMg</i>	2
<i>dNTPs</i>	1
<i>TRF3</i>	0,5
<i>TRF4</i>	0,5
<i>Taq pol</i>	0,5
<i>ADN</i>	5
<i>Volumen Final</i>	50

- b. En el termociclador se programaron los siguientes pasos:
  - i. Desnaturalización inicial a 95 °C durante 10 minutos.

- ii. 35 ciclos de 95°C durante 30 segundos (desnaturalización); 60 °C por 30 segundos (alineación), y 72 °C por 1 minuto (extensión).
    - iii. Extensión final de 72 °C por 7 minutos.
  - c. Para la posterior visualización del producto de PCR se preparó un gel de agarosa al 1 % conteniendo 30 ml de TBE 1X y 0.3g de agarosa, más 3 µl de BR® Safe DNA gel.
  - d. Se sembraron 3 µl de ADN amplificado mezclado con 1 µl de lueJuice™ (Gel Loading Buffer) que facilitó la carga y el seguimiento del producto en el gel de agarosa. Se realizó una corrida electroforética a 80v durante 30 segundos.
- V. **Interpretación de los resultados:** si una muestra es positiva a *T. foetus*, mostrará una banda para TRF1-TRF2 y otra para TRF3-TRF4; si es negativa a *T. foetus* (desarrolló Tetra o Pentatrichomonas) solo mostrará una banda para TRF1-TRF2, y no lo hará para TRF3-TRF4.

#### **4. Resultados**

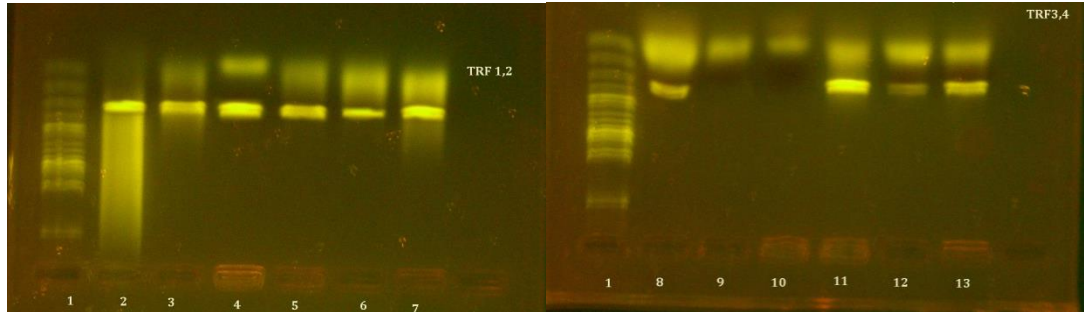
Durante el año 2015, ingresaron al CEDIVE 14.700 muestras, de las cuales 177 mostraron crecimiento de *Thichomonadidas*, y en 29 (16,4%) de estas no fue posible alcanzar la identificación de la especie mediante cultivo y tinción. Todas estas muestras amplificaron para TRF1 y 2, mientras que solo 4 de ellas fueron positivas para los genes TRF 3 y 4 (ver anexo 1).

## 5. Discusión y conclusión

Todas las muestras analizadas por PCR pertenecieron al género *Trichomonas*, mientras que 4 de ellas correspondieron a la especie *T. foetus*. La técnica tradicional de cultivo y posterior tinción para identificación de las especies de *Trichomonadidos* en algunas ocasiones no alcanza para definir la especie implicada. Este trabajo refuerza la evidencia que en los medios de cultivo, pueden crecer otras especies de *Trichomonas* que, incluso con posterior tinción, son difíciles de diferenciar. Con las tinciones de rutina es difícil diferenciar los flagelos y la forma de los distintos protozoarios ya que poseen morfología y tamaño similar entre ellos. Realizar la identificación exacta de *Trichomonas foetus* es muy importante ya que los animales positivos son descartados del rodeo (Ondrak, 2016). La aplicación de la técnica de PCR en muestras problema, brinda una excelente herramienta para lograr un diagnóstico certero, pero como desventaja se plantea que presenta un alto costo y que no siempre está disponible en todos los laboratorios. Mediante la técnica de PCR se puede garantizar una decisión correcta en relación a la eliminación de un toro falso positivo.

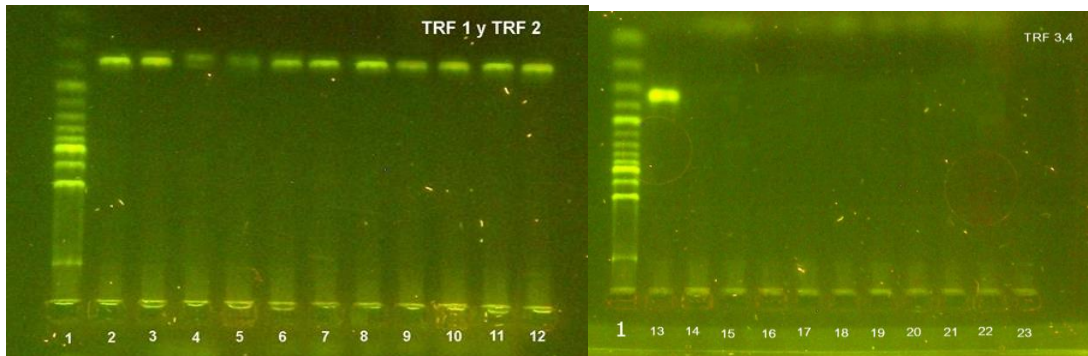
## 6. Anexo

**Imagen 1. PCR Trichomonadido GEL 1**



CALLE	MUESTRA SEMBRADA	Gel 1
1	Marcador de peso molecular 100 bp	
2	Control positivo ( <i>Tritrichomonas foetus</i> ) TRF 1,2	
3	Control negativo ( <i>Tetratrichomonas</i> spp.) TRF 1,2	
4	Muestra 1 TRF 1,2	
5	Muestra 2 TRF 1,2	
6	Muestra 3 TRF 1,2	
7	Muestra 4 TRF 1, 2	
8	Control positivo ( <i>Tritrichomonas foetus</i> .) TRF 3,4	
9	Control negativo ( <i>Tetrarichomonas</i> spp.) TRF 3,4	
10	Muestra 1. TRF 3,4	
11	Muestra 2 TRF 3,4	
12	Muestra 3 TRF 3,4	
13	Muestra 4 TRF 3, 4	

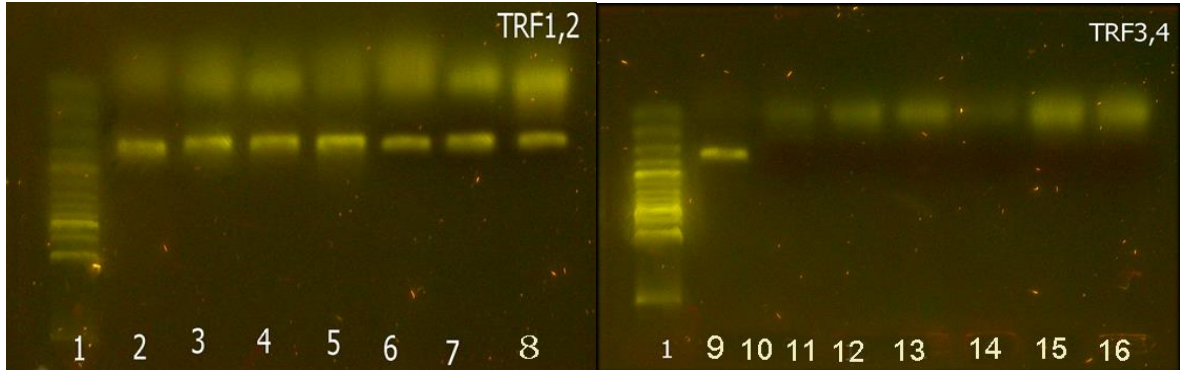
**Imagen 2. PCR trichomomadidos “GEL 2”**



CALLE	MUESTRA SEMBRADA	GEL 2
1	Marcador de peso molecular 100 bp	
2	Control positivo ( <i>Trichomonas foetus</i> ) TRF 1,2	
3	Control negativo ( <i>Tetratrichomonas</i> spp.) TRF 1,2	
4	Muestra 5 TRF 1,2	
5	Muestra 6 TRF 1,2	
6	Muestra 7 TRF 1,2	
7	Muestra 8 TRF 1, 2	
8	Muestra 9 TRF1,2	
9	Muestra 10 TRF1,2	
10	Muestra 11 TRF 1,2	
11	Muestra 12 TRf 1, 2	
12	Muestra 13 TRF 1, 2	
13	Control positivo ( <i>Trichomonas foetus</i> .) TRF 3,4	
14	Control negativo( <i>Tetrarichomonas</i> spp.) TRF 3,4	
15	Muestra 5 TRF 3,4	
16	Muestra 6 TRF 3,4	
17	Muestra 7 TRF 3,4	
18	Muestra 8 TRF 3, 4	
19	Muestra 9 TRF 3, 4	
20	Muestra 10 TRF3, 4	
21	Muestra 11 TRF 3,4	
22	Muestra 12 TRF3,4	

23 Muestra 13 TRF 3,4

**Imagen 3. PCR Trichomonadidos GEL 3**

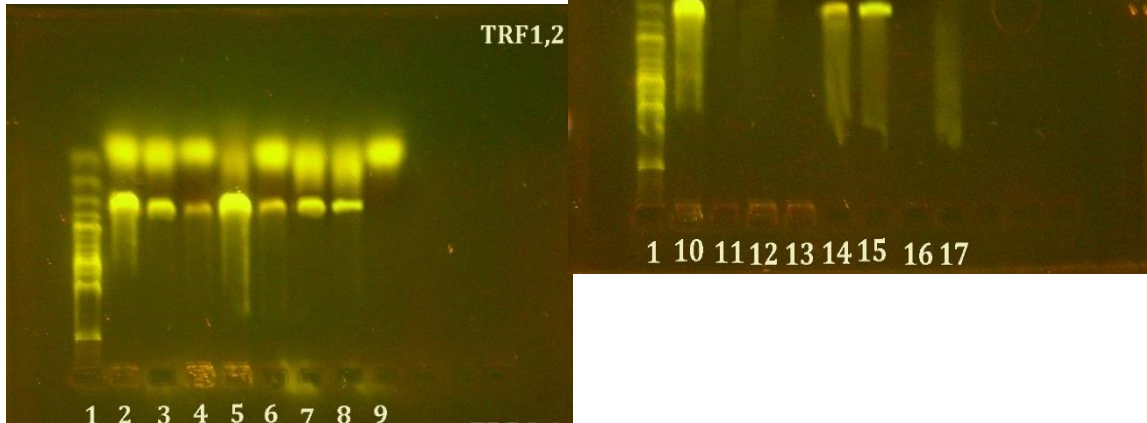


CALLE	MUESTRA SEMBRADA	GEL 3
1	Marcador de peso molecular 100 bp	
2	Control positivo ( <i>Tritrichomonas foetus</i> ) TRF 1,2	
3	Control positivo ( <i>Tetratrichomonas</i> spp.) TRF 1,2	
4	Muestra 14 TRF 1,2	
5	Muestra 15 TRF 1,2	
6	Muestra 16 TRF 1,2	
7	Muestra 17 TRF 1, 2	
8	Muestra 18 TRF1, 2	
9	Control positivo ( <i>Tritrichomonas foetus</i> .) TRF 3, 4	
10	Control negativo ( <i>Tetrarichomonasspp.</i> ) TRF 3, 4	
11	Muestra 14 TRF 3, 4	
12	Muestra 15 TRF 3, 4	
13	Muestra 16 TRF 3,4	
14	Muestra 17 TRF 3, 4	
15	Muestra 18 TRF 3, 4R	



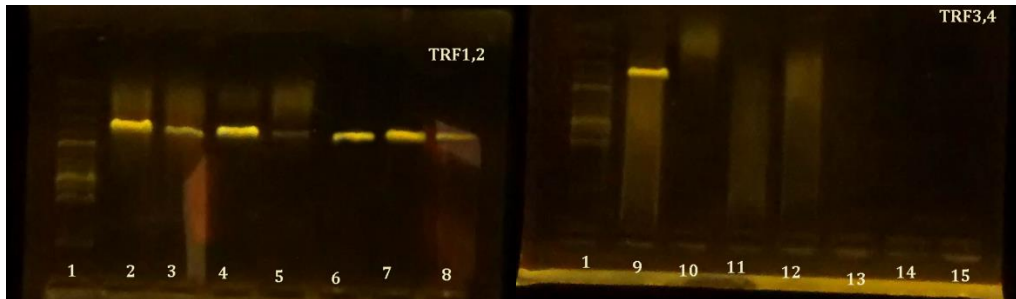
Imagen 4. PCR *Trichomonadidos* GEL

4



CALLE	MUESTRA SEMBRADA	GEL 4
1	Marcador de peso molecular 100 bp	
2	Control positivo ( <i>Trichomonas foetus</i> ) TRF 1, 2	
3	Control positivo ( <i>Tetratrichomonas</i> spp.) TRF 1, 2	
4	Muestra 19 TRF 1, 2	
5	Muestra 20 TRF 1, 2	
6	Muestra 21 TRF 1, 2	
7	Muestra 22 TRF 1, 2	
8	Muestra 23 TRF1, 2	
9	Muestra 24 TRF1, 2	
10	Control positivo ( <i>Trichomonas foetus</i> ) TRF 3, 4	
11	Control negativo ( <i>Tetratrichomonas</i> spp.) TRF 3, 4	
12	Muestra 19 TRF 3, 4	
13	Muestra 20 TRF 3, 4	
14	Muestra 21 TRF 3, 4	
15	Muestra 22 TRF 3, 4	
16	Muestra 23 TRF 3, 4	
17	Muestra 24 TRF3, 4	

**Imagen 5. PCR *Trichomonadidos* Gel 5**



CALLE	MUESTRA SEMBRADA	GEL 5
1	Marcador de peso molecular 100 bp	
2	Control positivo ( <i>Trichomonas foetus</i> ) TRF 1, 2	
3	Control negativo ( <i>Tetratrichomona</i> ssp.) TRF 1, 2	
4	Muestra 25 TRF 1, 2	
5	Muestra 26 TRF 1, 2	
6	Muestra 27 TRF 1, 2	
7	Muestra 28 TRF 1, 2	
8	Muestra 29 TRF1, 2	

## 7. Bibliografía

- Abbitt B, Meyerholz GW. *Trichomonas foetus* infection of range bulls in South Florida. *Vet Med Small Anim Clin* 1979;74:1339–1342.
- Campero CM, C. Rodriguez, Dubrab, A. Bolondic, C. Cacciatoa, E. Cobia, S. Perez, A. Odeona, A. Cipollaa, R.H. Bon Durante. Two-step (culture and PCR) diagnostic approach for differentiation of non-*T. foetus* trichomonads from genitalia of virgin beef bulls in Argentina. *Veterinary Parasitology*. 2003; 112; 167–175.
- Cobo E, P Favetto, V.M. Lane, A. Friend, K. VanHooser, J. Mitchell, R.H. BonDurant. Sensitivity and specificity of culture and PCR of smegma samples of bulls experimentally infected with *Trichomonas foetus*. *Theriogenology*; 2007; 68; 853–860
- Cobo Eduardo Rubén y Campero Carlos Manuel. Nuevos aspectos inmunológicos y vacunales de la tricomoniasis bovina. *Rev. de Medicina Veterinaria*, Bs. As., 2002; 83: 203-208.
- Felleisen RSJ y col. Detection of *Trichomonas foetus* by PCR and DNA Enzyme Immunoassay Based on rRNA Gene Unit Sequences. *J. CLIN. MICROBIOL*. 1998; 36:2; 513-519.
- Hayes Dawn C, Rebecca R Anderson, Richard L. Walker Identification of trichomonadid protozoa from the bovine preputial cavity by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism typing *J VET Diagn Invest* 2003; 15; 390–394.
- Mutto AA, S Giambiaggi, SO Angel. PCR detection of *Trichomonas foetus* in preputial bull fluid without prior DNA isolation *Veterinary Parasitology*. 2006.
- Ondrak, J. *Trichomonas foetus* Prevention and control in cattle. *Vet Clin Food Anim*. 2016.
- Sanchez RO, Boerco CA, Presencia de trichomonadidas y otros protozoos no patógenos durante 5 años de diagnóstico de tricomonas. *VetArg*. Vol xxx. Julio 2013; 303: 1-3.
- Soto P, Monteavaro C, Echevarría H. Epidemiología y control de la Trichomonosis bovina. En: *Enfermedades parasitarias de importancia clínica y productiva en rumiantes*. 1ra. Edición. Buenos Aires, Argentina, Ed Hemisferio Sur, 2013, p 381-402.

- Vignau ML, Venturini LM, Romero JR. Parasitología práctica. 1ra Edición. La Plata, Argentina, Ed de la Universidad Nacional de La Plata, 2001; 13-25.